

200839016A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質による子どもへの健康影響に関する  
エピジェネティクス評価法の開発に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

牧野 恒久 [社] 有隣厚生会東部病院長

分担研究者

中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教授

塩田 邦郎 東京大学大学院 農学生命科細胞生化学教授

杉野 法広 山口大学大学院研究科 産婦人科学教授

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
**化学物質による子どもへの健康影響に関するエピジェネティクス評価法の開発**  
 平成20年度 総括・分担研究報告書

《目次》

I. 総括研究報告

<u>化学物質による子どもへの健康影響に関するエピジェネティクス評価法の開発に関する研究</u> .....	4	
主任研究者	牧野 恒久	〔社〕有隣厚生会東部病院長

II. 分担研究報告

<u>1. 生体試料中のピレスロイド系農薬,</u> <u>有機リン系農薬及びビスフェノール A の暴露評価に関する研究</u> .....	12	
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者	堀江 正一	埼玉県衛生研究所
	石井 里枝	埼玉県衛生研究所
<u>2. ヒト母乳試料中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発及び LC/MS を用いた</u> <u>ヒト生体試料の分析法の開発と分析法の精度管理</u> .....	18	
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
	斉藤 貢一	星薬科大学薬品分析化学教室
	伊藤 理恵	星薬科大学薬品分析化学教室
	岩崎 雄介	星薬科大学薬品分析化学教室
<u>3. 胎脂試料中のポリ臭素化ジフェニルエーテルの分析</u> .....	23	
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者	阿久津 和彦	大阪府立公衆衛生研究所
	高取 聡	大阪府立公衆衛生研究所
<u>4. 胎児期のフタル酸エステル類の暴露実態の解明</u> .....	29	
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者	高取 聡	大阪府立公衆衛生研究所
	阿久津 和彦	大阪府立公衆衛生研究所
	近藤 文雄	愛知医科大学
<u>5. 周産期の母親の毛髪及び羊水中多元素一斉分析による 新たな暴露評価手法に関する研究</u> .....	42	
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者	林 留美子	愛知県衛生研究所

6. <u>胎内環境中に存在する化学物質の把握に関する研究</u> .....	48
分担研究者    杉野 法広    山口大学院医学系研究科	
研究協力者    墨絵 正大    山口大学院医学系研究科	
7. <u>胎児へのエピジェネティックな影響の解析：エピミュタゲン評価法に関する研究</u> .....	53
分担研究者    塩田 邦郎    東京大学大学院 能楽生命科学研究科細胞生化学	
研究協力者    大鐘 潤    東京大学大学院 能楽生命科学研究科細胞生化学	
広沢-高森 瑞子    東京大学大学院 能楽生命科学研究科細胞生化学	
新井 良和    東京大学大学院 能楽生命科学研究科細胞生化学	
呉 颯英    東京大学大学院 能楽生命科学研究科細胞生化学	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	59
IV. 研究成果刊行物・別刷.....	62

## 化学物質による子どもへの健康影響に関するエピジェネティクス評価法の 開発に関する研究

研究代表者 牧野 恒久 〔社〕有隣厚生会東部病院長

### 研究要旨

本研究では次代の社会の担い手である子どもを取りまく環境中のどのような化学物質が健康影響を及ぼすか、どの程度の生体暴露量が健康障害に結びつくかなどを新しいエピジェネティクスの手法から解明することを目的とした。とくに化学物質の生体暴露量測定法の開発、信頼しうる暴露量の入手、その暴露量内での健康評価方法の開発をワンセットで行った。

研究期間 3 年の第 1 年度の当たる本年は多くの化学物質の中から、子どもの健康被害が想定しうる化学物質の絞込みを行った。その結果、本研究では近年母乳中の汚染が懸念され樹脂の難燃剤として多用されるポリ臭素化ジフェニルエーテル、プラスチックの可塑剤であるフタル酸エステル類、家庭で使用される農薬の 90%以上を占めるピレスロイド系農薬、一般農薬の過半を占める有機リン系農薬、喫煙に関するニコチン、コチニン、すでに河川・湖沼での汚染が確認されている撥水剤である有機フッ素系化合物（とくにパーフルオロ化合物）、24 種の重金属類などを対象物質として選択した。これらの物質の暴露量測定開始にあたり、杉野班で、周産期のヒト試料、とくに母体血、臍帯血、羊水、胎脂などの採取にあたり、採取器具、採取手技などから人工夾雑物が混入しないことを確認した。その上で中澤班では、これら物質に対する感度、特異性に優れた質量分析法を開発した。塩田班では中澤班の生体暴露量情報に基き、マウス ES 細胞のヘテロクロマチン形成から有機リン系農薬の代謝産物 DEP, 重金属のセレンをエピジェネティクス変化を惹起する物質として特定し、開発したゲノムワイドメチル化解析法、D-REAM(T-DMR Restriction-tag-mediated amplification)法により遺伝子領域の DNA メチル化プロファイルを解析した。その結果これら二つの物質は母体・胎児環境中に検出される濃度で、DNA メチル化に影響を与えていること、ならびにこれら化学物質の影響を受ける遺伝子領域が明らかになった。また次年度以降ヒト iPS 細胞での解析を行う準備としてマウス、ヒト両者の iPS 細胞の DNA メチル化プロファイル解析をおこなった。

研究分担者氏名・所属研究機関名及  
び所属研究機関における職名

中澤 裕之：星薬科大学薬品分析化学教授

塩田 邦郎：東京大学大学院  
農学生命科細胞生化学教授

杉野 法広：山口大学大学院研究科  
産婦人科学教授

## A. 研究目的

### 1. 生体資料中のピレスロイド系および有機リン系農薬分析法の開発と暴露評価法に関する研究

環境中には多種多様な化学物質が放出され、ヒトを含む生態系への影響が強く懸念されている。特にこれらの化学物質が胎児や乳幼児にどの程度移行しているのか、移行した化学物質が胎児や乳児の発生または発育時期にどの程度の影響を及ぼしているかについては十分解明されていない。本研究では、食品や大気などを介しての高頻度な暴露が危惧されている種々の合成化学物質の中から、家庭内で使用されている殺虫剤の9割近くを占めるピレスロイド系農薬、及び殺虫剤として世界的に最も汎用されている有機リン系農薬について、母体決、臍帯血、母体尿中の暴露状況を把握し、これら化学物質による胎児、乳児に及ぼす影響を検証する基礎資料とすることを目的とした。

### 2. HILIC/MS/MSによるヒト血清中ニコチン代謝物の同時分析法の開発

ヒト生態系へ影響が懸念される化学物質の中でタバコ煙の構成物質は4000種類ともいわれる。わが国では現在常習的に喫煙している者の割合は年々減少しているにもかかわらず、男性では約4割、女性では約1割といまだ高い喫煙率を示している。喫煙による慢性肺疾患やがん等の生体影響が懸念される中、妊婦におけるタバコ煙暴露では臍帯血流量の減少、胎児に低酸素状態、低栄養状態をもたらすことから子宮内胎児発育遅延、早産、死産、先天異常、出生時の体重減少等が高頻度に発生するとされている。タバコ煙暴露実態の評価のバイオマーカーとされるニコチン代謝について、ヒト生体中のニコチン、コチニンを同時分析する親水性相互作用クロマトグラフィー/タンデム質量分析法

(HILIC/MS/MS)を開発することを目的とした。

### 3. ポリ臭素化ジフェニルエーテルの子どもへの暴露評価に関する研究

ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) は、合成樹脂の難燃剤として国内外で広く使用されてきた化学物質である。近年、北米地域を中心に世界的なPBDEs汚染の拡大が明らかにされ、環境中でのPBDEsの長期残留性や生物蓄積性が問題視されている。これらPBDEsの一部異性体は、甲状腺機能や脳神経機能のかく乱作用を有することが報告されており、特に子どもへの悪影響が懸念されている。一方、子どものPBDEs暴露実態については未だ不明の点が多い。本研究では胎児期のPBDEs暴露評価を目的として、同位体希釈法を用いた胎脂試料の高精度分析法の構築を目的とした。

### 4. 胎児期のフタル酸エステル類の暴露実態の解明

フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP) に代表されるフタル酸ジエステル類は、主に可塑剤として塩化ビニル樹脂製品等(電線被覆、建材、内装品、包装、塗装、雑貨および医療器具等)に多用されており、日本人は日常的にこの化学物質に暴露されていると考えられる。体内に取り込まれたこの化学物質は速やかにフタル酸モノエステル類に代謝される。フタル酸モノエステル類の一部は発生・発育過程にある精巣に悪影響を及ぼすことが明らかにされており、妊婦、子どもへの暴露実態の解明が求められている。本研究ではこの物質の直接影響を受ける胎児の暴露状況を明らかにするために、胎児の生育環境を反映する生体試料(血清、羊水、胎脂)中のフタル酸エステル類を分析することを目的とした。

## 5. 周産期の母親の毛髪および羊水中多元素一斉分析による新たな暴露評価手法に関する研究

毛髪中には水銀、ヒ素、鉛などの重金属類が蓄積しやすい傾向にあり、毛髪を試料とすることにより数ヶ月から数年という比較的長期間の暴露情報が得られると期待されている。また、胎児は子宮内で羊水に直接接しており、このことから羊水は胎児の有害元素に対する暴露源となる。本研究では ICP-MS 法による毛髪および羊水中多元素一斉分析法を開発することを目的とする。

## 6. 胎児環境中に存在する化学物質の把握に関する研究

次代の社会の担い手である子どもを取りまく胎内環境中のどのような化学物質が児の健康に影響を及ぼすか、どの程度の暴露量が児の健康障害に結びつくかを、新しいエピジェネティクス的手法を用いて解明することが本研究の目的であるが、本年度は周産期の母・児環境を母体血、臍帯血、羊水、胎脂、母乳、毛髪などから検討すべく、試料を採取方法の検討から始めた。

## 7. 胎児へのエピジェネティクスな影響の解析：エピメュータゲン評価法に関する研究

エピジェネティクスは、塩基配列の変化を伴わない、細胞分裂後も継承される遺伝子機能を研究する学問領域である。近年、発生異常や癌など多くの疾患において様々な遺伝子のエピジェネティクス異常がこれらの病態に関連していることが明らかになりつつある。本研究では身近に存在する化学物質が胎児発生に及ぼす影響について、初期胚のモデルと考えられる ES 細胞を用いたエピジェネティクス解

析により、胎児のエピジェネティクス状況に影響を与える可能性のある化学物質（エピメュータゲン）のスクリーニング系を確立することを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 生体試料中のピレスロイド系および有機リン系農薬分析法の開発および暴露評価に関する研究

ピレスロイド系農薬の暴露評価では暴露マーカーとして主代謝産物の 3-phenoxybenzoic acid(3-PBA)を指標成分として、有機リン系農薬ではシロアリ駆除や家庭用殺虫剤として汎用されるクロルピリホスの主代謝産物 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol(TCP)の分析法を開発した。

#### 2. ヒト母乳試料中有機フッ素系化合物一斉分析法の開発および LC/MS を用いたヒト血清中ニコチンおよびコチニンの分析に関する研究

HILC/MS/MS によるヒト生体試料中のニコチンおよびコチニンの分離定量法を検討した。分離カラムには Waters 社製 HILC カラム (2.1 X 100 mm) を用いた。移動相にはギ酸濃度が 0.01%となるように設定した水とアセトニトリルの混液を使用することで、目的物質の良好な相互分離が達成された。検出下限値(S/N=3)は 1~10ng/ml, 定量下限値 (S/N>10) は 5~25ng/ml であった。試料の前処理として、夾雑成分の除去を目的に固相抽出法を採用し、固相抽出のカートリッジには OasisMCX を使用することで、試料の精製・濃縮が達成された。なお有機フッ素系化合物のヒトへの暴露解析は次年度以降に検討することとした。

### 3. ポリ臭素化ジフェニルエーテルの子どもへの暴露評価に関する研究

測定対象の胎脂は測定に供する試料量が極めて限られることから、前処理の予備検討には市販の牛ケンネ脂（ウシの腎臓周囲の脂肪組織）を用いた。

標準物質には Wellington Laboratories 製の PBDEs 混合液（BDE-MXE）を用い、3~10 臭素化物の代表的な 10 種類の異性体

（#28,#47,#99,#100,#153,#154,#183,#197,#207,#209）を測定対象物質とした。また内標準物質（クリーンアップスパイクおよびシリンジスパイク）には同社製の炭素安定同位体（ $^{13}\text{C}$ ）標準化 PBDEs 混合溶液（MBDE-MXE および MBDE-139）を用いた。秤取した試料にクリーンアップスパイクを添加した後、脂溶成分をエタノール/ヘキサン混合溶媒により抽出し、硫酸シリカゲルカラム処理およびアセトニトリル/ヘキサン分配処理を加えて精製し、シリンジスパイクを加えて最終  $20\ \mu\text{L}$  のノナン溶液として GC/MS 測定に供した。

### 4. 胎児期のフタル酸エステル類の暴露実態の解明

#### 血清および羊水中の DEHP, MEHP の分析

試料  $0.5\text{g}$  に内部標準およびアセトンを加えて攪拌後、超音波照射を 2 分間行った。続いてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離（ $3,000\text{rpm}$ , 10 分間）した。アセトン層を別の清浄なガラス製試験管に回収し、残渣にアセトン  $1\text{mL}$  を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離（ $3,000\text{rpm}$ , 10 分間）した。アセトン層を回収し、先のアセトン層と合わせて窒素気流下で乾固した。次に Milli-Q 水  $0.5\text{mL}$  および酢酸  $4\ \mu\text{L}$  を加えて溶解した。ヘキサン  $1\text{mL}$  を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪

拌し、遠心分離（ $3,000\text{rpm}$ , 10 分間）した。ヘキサン層を別の清浄なガラス製試験管に回収した。水層にヘキサン  $1\text{mL}$  を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離（ $3,000\text{rpm}$ , 10 分間）した。この操作を再度行い、さきのヘキサン層と合わせて窒素気流下で乾固した。アセトニトリル  $0.5\text{mL}$  に溶解して LC/MS/MS 試験液とした。

#### 胎脂中の DEHP および MEHP の分析

胎脂を  $0.025\text{g}$  を目安に清浄なガラス製試験管に採取し、重量を記録した。次に内部標準およびアセトン  $4\text{mL}$  を加えて攪拌した後、超音波照射を 2 分間行った。続いてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離（ $3,000\text{rpm}$ , 10 分間）した。上清を回収し、窒素気流下で乾固した。次にヘキサン  $1\text{mL}$  を加えて溶解し、アセトニトリル  $2\text{mL}$  を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離（ $3,000\text{rpm}$ , 10 分間）した。アセトニトリル層を別の清浄なガラス製試験管に回収した。ヘキサン層にアセトニトリル  $2\text{mL}$  を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離（ $3,000\text{rpm}$ , 10 分間）した。先のアセトニトリル層と合わせて窒素気流下で乾固し、アセトニトリルに溶解して測定した。

### 5. 周産期の母親の毛髪および羊水中多元素一斉分析による新たな暴露評価法手法に関する研究

採取した毛髪では、リチウム、ホウ素、マグネシウム、アルミニウム、カルシウム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、ヒ素、セレン、ルビジウム、ストロンチウム、モリブデン、銀、カドミウム、スズ、アンチモン、バリウム、水銀、鉛、ビスマスの 24 元素、羊水では上記項目からヒ素、銀、スズ、ビスマスを除いた 20 元素をそれぞれの測定対象とした。前処理はマイクロ波分

解法を用い、誘導結合プラズマ質量分析装置 ICP-MS(Alilent 7500i,横河アナリテイカルシステム)を用いて測定した。測定条件として内部標準元素 Sc(45),Y(89),Ir(193)を各 10ppb となるように添加、干渉補正式を  $Se(78)=(78)*1-(76)*0.1869$  とした。

## 6. 胎内環境中に存在する化学物質の把握に関する研究

山口大学病院にて平成20年7月に医薬品等治験臨床研究等審査委員会で承認された計画の下にヒト試料を採取した。本病院で分娩を行う妊娠37週0日から妊娠41週6日までの正常単胎妊婦を対象とした。通院中に妊婦外来において臨床研究(具体的な検体採取)の説明を行い、後日承諾書を持参した患者に限り分娩前後に検体採取を行った。

アンケート調査票は入院後に配布し、退院前に回収した。

## 7. 胎児へのエピジェネティックな影響の解析：エピミュタゲン評価法に関する研究 化学物質暴露 ES 細胞のゲノム DNA 抽出

マウス ES 細胞をゼラチンコートディッシュ上で血清濃度の DEP(0.1ppb) または Se(100ppb)を添加したものと、コントロールとして溶媒のみを添加したものを 96 時間培養し、定法に従いそれらの細胞からゲノム DNA を抽出した。D-REAM 法によりゲノムワイド DNA メチル化解析を行うために、DEP または溶媒のみに暴露させたマウス細胞から抽出したゲノム DNA をメチル化 HpyCH41V 消化し、その後アダプターライゲーション PCR により非メチル化領域を増幅し、マウスプロモーターアレイとハイブリデーションし遺伝子領域の DNA メチル化解析を行った。COBRA 法による遺伝子領

域の DNA メチル化解析を行うために、上記ゲノム DNA についてパイサルファイト反応を行い、その後 COBRA 法による DNA メチル化解析を行った。パイサルファイト反応済みゲノム DNA を PCR 増幅後、HpyCH41V による切断を行い、切断断片をマイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 (MultiNA) により解析した。さらに得られた切断断片の面積値より DNA メチル化率を算出した。

## C & D 研究結果、考察

### 1. 生体試料中のピレスロイド系および有機リン系農薬分析法の開発と暴露評価に関する研究

BPA,3-PBA,TCP の個々の分析測定については、平成14年厚生労働科学研究以来その成果を年次報告してきたが、本研究では血清および尿中の BPA,3-PBA,TCP を同時に分析可能な前処理法の構築を試みた。これら化学物質は血清、尿中で主にグルクロン酸抱合体として存在することが知られており、 $\beta$ -グルクロニダーゼ ( $\beta$ -グルクロニダーゼ 6,500units/ml, スルファターゼ 160units/ml) 50 $\mu$ L、90 分処理で脱抱合体処理を行い、親水性および疎水性化合物の保持能に優れたポリマー逆相系 OasisHLB にて前処理を行った。本法による尿試料 3-PBA および TCP の添加回収率 (5ng/mL 添加) は、それぞれ平均で 82.7%, 80.5%、相対標準偏差 RSD は 7.5%,6.8% であった。本法による検出限界は 0.2ng/mL であった。一方、BPA の添加回収率 (5ng/mL 添加) は、85.2%、相対標準誤差 RSD4.7%であった。本法による検出限界は 0.5ng/mL であった。構築されたこれら測定法による実試料分析は山口大学医学部から提供された母体血、母体尿、臍帯血各 10 組、合計 30 検体について行われ、いずれの



試料からも3-PBA(検出下限0.2ng/mL)、TCP(検出下限0.2ng/mL)、BPA(検出下限0.5ng/mL)は検出されなかった。

## 2. ヒト母乳試料中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発およびLC/MSを用いたヒト血清中ニコチンおよびコチニンの同時分析に関する研究

血清中のニコチン、コチニンを同時分析するため、MSにおける条件の最適化を図った。ニコチン代謝物は高極性物質であるので、ODSカラムに替えて高極性物質の保持が可能な、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)を採用し、それぞれの化合物の相互分離を達成した。血清を対象とした本分析においてサロゲート物質を用いた内部標準法を採用したことにより、精度の高い分析法が構築できた。標準品を用いた検出限界(S/N=3)および定量限界(S/N=10)はニコチンにおいて1およびng/mlであった。検量線を作成した結果LOQ~200ng/mlの濃度範囲において良好な直線性(0.99)が得られた。ヒト暴露評価のために同一のヒト妊婦の母体、臍帯血(n=10)を分析した。その結果、10検体中一つのペア検体からニコチンの代謝物であるコチニン、ヒドロキシコチニンが検出され、タバコによる胎児汚染が窺われた。有機フッ素系化合物の暴露解析は次年度以降の課題とした。

## 3. ポリ臭素化ジフェニルエーテルの子どもへの暴露評価に関する研究

胎脂の模擬試料として牛ケンネ脂を持ち得た添加回収試験(PBDEs 0.1~0.5ng 添加)を実施したところ、測定対象とした10種類のPBDEsの平均回収率は93~101%、相対標準偏差は7.3%以下の良好な結果を得た。また操作ブランク値を基に算出したPBDEsの検出下限値(ブ

ランク値の平均+3SD)は、胎脂試料で0.01~0.1ng/g、母乳試料で0.001~0.01ng/g、定量下限値(ブランク値の平均+10SD)は胎脂0.02~0.3ng/g、母乳試料で0.002~0.03ng/gであった。構築した分析法を胎脂試料に適用したところ、分析した2例の胎脂(症例No.12, No.25)から0.03ng/gのBDE-153(2,2',4,4',5,5'-HxBDE)が検出され、胎内のPBDEs汚染が示唆された。これまでに胎脂試料を対象としたPBDEs分析の報告例はなく、今回の予備的なモニタリングにおいて、微量であるが胎脂試料からPBDEs異性体が検出されたことは興味深い知見である。またBDE-153は胎脂試料分析時の指標異性体の一つとして有用と考えられた。

## 4. 胎児期のフタル酸エステル類の暴露実態の解明

母体血、臍帯血、羊水それぞれの試料中の暴露されたDEHPおよびMEHP分析結果は以下のようになった。

DEHPは母体血清の66.7%に定量下限(10ng/ml)を超える濃度で検出された。中央値は12.7ng/mlで、最高検出濃度は460ng/mlであった。臍帯血清中では11.5%に定量下限を超える濃度で検出された。中央値10ng/ml未満で、最高検出値は18.2ng/mlであった。羊水中では60%に定量下限を超えるDEHPを検出した。中央値は13.1ng/mlで、最高検出濃度は190ng/mlであった。

MEHPは母体血清の33.3%に定量下限(2.0ng/ml)を超えて検出された。中央値は2.0ng/ml未満で、最高検出値は9.9ng/mlであった。臍帯血清中では3.58%に定量下限値を超えて検出され、中央値は2.0ng/ml未満で、最高検出値は3.9ng/mlであった。羊水中では80%に定量下限を超えるMEHPが検出され、中央値は

7.7.ng/mlで、最高検出値は28.2ng/mlであった。胎脂中のDEHPは3試料中1例に比較的高い濃度 7,140ng/g で検出されたが他の2例では定量下限値 (440ng/g) 未満あるいはそれに近い値であった。MEHP は3検体とも定量下限値 (80ng/g) 未満であった。

以上の結果は羊水中には臍帯血清中に比較して、高い割合で DEHP,MEHP 共に検出され、子宮内にこれら物質が貯留している可能性が示唆された。胎児は常に羊水と接しており、羊水はこれら物質の暴露経路のひとつである可能性が示された。

#### 5. 周産期の母親の毛髪および羊水中多元素一斉分析による新たな暴露評価手法に関する研究

マイクロ波分解法で前処理し誘導結合プラズマ質量分析法で毛髪試料に対して24元素を1~500ppm濃度で添加・回収率を検討したところ、各元素の回収率は91~110%、変動係数は0.34~7.3%と良好な結果を示した。本法に基づいてヒト毛髪35検体(男23名、女12名)の分析を行ったところ、これまでのICP-MS法による測定値と同程度の値が得られた。そこで羊水試料についても本法による添加・回収検討を行い、20元素の回収率82~105%、変動係数0.43~3.5%の良好な結果が得られ、次年度の羊水、毛髪実試料の分析の道を開いた。

#### 6. 胎内環境中に存在する化学物質の採取・把握に関する研究

胎脂採取に用いた舌圧子の包装紙と試料保存用試験管のキャップから比較的高い濃度のフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) が検出された。その他の試料採取や保存に使用する器具からは化学物質の混入は認められなかった。測定感度から勘案すると、毛髪試料はより十分な量の採取が必要なことが判明した。試料採取は平成20年9月より開始し、本年度は54症例の試料採取と臨床情報を得ることができた。

#### 7. 胎児へのエピジェネテイクスな影響の解析：エピニュータゲン評価法に関する研究

有機リン系農薬の代謝産物 DEP による遺伝子領域の DNA メチル化状況への影響について D-REAM 法および COBRA 法を用いて解析したところ、DEP 暴露細胞では、*Cdc6* や *Upk1b* (ガン関連遺伝子) でのメチル化亢進、*Lep* (代謝関連遺伝子) でのメチル化低下、*M6pr* (膜輸送関連遺伝子) でのメチル化亢進などいくつかの遺伝子領域で DNA メチル化プロファイルが変化する事実が明らかになった。

同じくマウス ES 細胞を用いて Se の暴露による DNA メチル化プロファイル変化を解析したところ、解析した119遺伝子に共通して全体的な DNA 脱メチル化が生じていた。とくに脱メチル化度合いが大きい遺伝子として、*Nes* (神経分化関連遺伝子) や *Lpgat1* (膜局在アシル基転移酵素) が見出された。

これらの結果は、DEP、Se ともに母体血中への暴露量の範囲内でガン関連遺伝子や神経分化に関わる遺伝子などへ影響を及ぼすことが判明し、胎児のエピジェネテイクス状況にも影響を及ぼす可能性を示唆したことになる。本研究の結果はまた、ヘテロクロマチン形成、DNA メチル化

を指標にエピミュータゲンのスクリーニング系を確立しうることを示した。

#### E. 結論

本研究の最終ゴールは社会、家庭、職場においてヒト、とくに子どもが暴露される無数の化学物質の中から、生産・輸入量、内外の安全・衛生情報、健康被害報告などから絞り込まれた物質について、真に信頼すべく測定法の下に、生体内暴露量を測定し、この暴露量の範囲内で次代を担う子どもにいかに関与を及ぼすか、新しい毒性評価法を開発することにある。

三年研究の第一年度に当たる本年度の研究から以下の結論が導かれた。ヒトの測定対象試料、すなわち母体血、臍帯血、羊水、胎脂、毛髪などの採取手技について、測定前に挟雑物質が混入しない採取法が確立された。各々の試料、各物質に対して、それぞれ特異性、測定感度に優れた質量分析法が開発できた。従来の毒性試験と異なりヒト血清中の暴露濃度の範囲内で、有機リン系農薬の代謝産物 DEP や Se 元素などがマウス初期胚のモデルと考えられる ES 細胞において遺伝子領域の DNA メチル化状況に影響を与えることを見出した。

次年度以降、ヒト iPS 細胞を用いてより具体的なエピミュータゲン解析を行う礎が得られた。

#### F. 健康危険情報

次年度以降、ヒト iPS 細胞で解析する。

#### G. 研究発表

報告書巻末の III. 研究成果の刊行に関する一覧表、IV. 研究成果の刊行物・別冊の項に一括してまとめた。

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

研究協力報告書

化学物質の子どもへの健康影響に関するエボージェネティックス評価法の開発

## 生体試料中のピレスロイド系農薬，有機リン系農薬及びビスフェノール A の暴露評価に関する研究

研究代表者 牧野恒久（東海大学医学部）  
研究分担者 中澤裕之（星薬科大学）  
研究協力者 堀江正一（埼玉県衛生研究所）  
石井里枝（埼玉県衛生研究所）

### 研究要旨

本研究では，食品や大気等を介しての高頻度な暴露が危惧されている種々の合成化学物質の中から，家庭内で使用される殺虫剤の9割近くを占めるピレスロイド系農薬，及び殺虫剤として世界的に最も汎用されている一つである有機リン系農薬クロルピリホスについて，また，最近，米国やカナダ政府において「胎児，乳児及び子供の神経系及び行動，前立腺や乳腺，女性の思春期への影響」を懸念する発表がなされているビスフェノールAについて，母体血，母体尿，臍帯血中の同時分析法を検討した．ピレスロイド系農薬の曝露評価では，曝露マーカーとして主代謝物である3-phenoxybenzoic acid (3-PBA)を，クロルピリホスの曝露評価には，主たる代謝物である3,5,6-Trichloro-2-pyridinol (TCP) を指標成分とした．本法を用いて山口大学医学部から提供された母体血，母体尿，臍帯血10組，計30検体を測定した結果，いずれも検出（検出限界3-PBA及びTCP=0.2，BPA=0.5ng/mL）されなかった．

### A. 研究目的

環境中には多種多様な化学物質が放出され，ヒトを含む生態系への影響が強く懸念されている．特に，これらの化学物質が胎児や乳幼児にどの程度移行しているのか，移行した化学物質が胎児や乳児の発生または発育時期にどの程度影響を及ぼしているのかについては十分解明され

ていない．そこで，本研究では，食品や大気等を介しての高頻度な暴露が危惧されている種々の合成化学物質の中から，家庭内で使用される殺虫剤の9割近くを占めるピレスロイド系農薬，及び殺虫剤として世界的に最も汎用されているものの一つである有機リン系農薬クロルピリホスについて，また，最

近,米国やカナダ政府において「胎児,乳児及び子供の神経系及び行動,前立腺や乳腺,女性の思春期への影響」を懸念する発表がなされているビスフェノール A について,母体血,母体尿及び臍帯血中の同時分析法を構築を試みた.さらに,構築した同時分析法を用いて母体血,母体尿及び臍帯血中の暴露状況を把握することを目的とした.

## B. 研究方法

### 1. 試料

母体血,母体尿及び臍帯血は山口大学医学部病院から提供されたものを用いた.採取した血液試料等は,常法に従って血清を調製し,15分以内に凍結し,測定するまで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した.母体尿は,採取後速やかに凍結し,血清試料と同様に測定するまで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した.

なお,母体血,母体尿及び臍帯血の採取と使用に関しては,いずれもインフォームドコンセントを十分行い,理解が得られたボランティアから採取するなど,倫理面への配慮を十分行った.

### 2. 試薬

標準品: 3-Phenoxybenzoic acid (3-PBA)及び 2-Phenoxybenzoic acid (2-PBA)はシグマ社製を用いた.

クロルピリホス代謝物 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol(TCP)は林純薬工業製を用いた.

ビスフェノール A (BPA)及びビスフェノール A-d<sub>16</sub> (BPA-d<sub>16</sub>)は関東化学(株)製を用いた.

標準溶液は,各標準品 20mg を精秤し,メタノール 50mL に溶解して標準原液を調製し,適宜希釈して標準溶液及び内部標準溶液とした.

$\beta$ -グルクロニダーゼ:シグマ社製 (130,000 units/mL) を用いた.

精製用カートリッジ: Oasis HLB カートリッジ(60 mg): Waters 製を用いた.カートリッジは予めメタノール 5 mL, 水 5mL の順でコンディショニングした後使用した.

その他の試薬はすべて特級品あるいは LC/MS 用, HPLC 用を用いた.

### 3. 装置及び測定条件

#### 3.1 尿及び血清中の 3-PBA 及び TCP の分析

高速液体クロマトグラフ-質量分析計: HPLC 装置には, Waters 社製 2695 HPLC システム, 質量分析装置には, Quattro micro API を使用した. 測定条件は表 1 のとおりとした.

#### 3.2 尿及び血清中の BPA の分析

高速液体クロマトグラフ-質量分析計: HPLC 装置には, Waters 社製 2695 HPLC システム, 質量分析装置には, Quattro micro API を使用した. 測定条件は表 2 のとおりとした.

### 4. 検量線の作成

#### 4.1 3-PBA 及び TCP の分析

内部標準物質として, 3-PBA の安定同位体標識内部標準物質が市販されていないことから, 3-PBA と構造が類似している 2-PBA を用いた. 内部標準物質 2-PBA を 20 ng 含んだ 3-PBA の 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 及び 100ng/mL の溶液を調製し, その 10 $\mu$ L を LC-MS/MS に注入した. 検出には MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法を採用し, それぞれモニターイオン  $m/z$  213>93 により得られた MRM クロマトグラムよりピーク面積を求め, 3-PBA と 2-PBA

の面積比により検量線を作成した。

TCP については、0.5~100 ng/mL の範囲で数点標準溶液を調製し、得られた MRM クロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

#### 4.2 BPA の分析

安定同位体標識内部標準物質 BPA-d<sub>16</sub> を 20 ng 含んだ BPA の 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 及び 100ng/mL の溶液を調製し、その 10 $\mu$ L を LC-MS/MS に注入する。検出には 3-PBA 及び TCP と同様に MRM(Multiple Reaction Monitoring)法を採用し、表 2 に示すモニターイオンにより得られた MRM クロマトグラムよりピーク面積を求め、BPA と BPA-d<sub>16</sub> の面積比により検量線を作成した。

#### 5. 試験溶液の調製

血液試料は 1mL、尿は 2mL を採り、内部標準物質である 2-PBA 及び BPA-d<sub>16</sub> を 20 ng 加えた後、0.2M 酢酸緩衝液(pH 5) 2mL、 $\beta$ -グルクロニダーゼ 6,500 units/mL (試薬  $\beta$ -グルクロニダーゼを 0.2 M 酢酸緩衝液(pH 5) で 20 倍希釈) を 50 $\mu$ L 加え、37°C で 90 分間インキュベートした。インキュベート後、Oasis HLB カートリッジ (60mg) に負荷し、水 5 mL で洗浄した。メタノール 5 mL でカートリッジから分析対象化合物を溶出し、減圧乾固後 40%メタノール 1mL (尿は 2mL) に溶解して試験溶液とした。

#### C. 結果及び考察

##### 1. 3-PBA, TCP 及び BPA の同時分析法

BPA, 3-PBA 及び TCP の分析に関してはこれまでの本研究事業で検討し、

それぞれ報告してきた。即ち、BPA の分析に関しては平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品・化学物質安全総合研究事業)「試料分析の信頼性確保と生体曝露量のモニタリングに関する研究: 主任研究者 牧野恒久」報告書に、3-PBA 及び TCP の分析に関しては平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究: 主任研究者 牧野恒久」報告書に報告した。そこで今回は、血清及び尿中の BPA, 3-PBA, TCP を同時に分析可能な前処理法の構築を試みた。

BPA, 3-PBA, TCP はいずれも血清や尿試料中では主にグルクロン酸抱合体として存在することが知られている。そこで、 $\beta$ -グルクロニダーゼによる脱抱合体処理条件を検討し、インキュベーションは 90 分、 $\beta$ -グルクロニダーゼの量は ( $\beta$ -グルクロニダーゼ 6,500 units/mL, スルファターゼ 160 units/mL) 50  $\mu$ L とした。

BPA, 3-PBA 及び TCP はカルボキシル基や水酸基を有するものの、構造的に疎水性を有する化合物と考えられる。そこで、親水性及び疎水性化合物の保持能にも優れたポリマー逆相系カートリッジ Oasis HLB を用いた前処理法を採用することにした。 $\beta$ -グルクロニダーゼによる脱抱合体処理を行った血清及び尿試料をカートリッジに直接負荷し、水で洗浄後、メタノールで溶出する簡便な前処理法を構築した。

本法による尿試料への 3-PBA 及び TCP の添加回収率 (5 ng/mL 添加) は、それぞれ平均で 82.7%, 80.5%, 相対標準偏差 RSD は 7.5% 及び 6.8% (n=5) であった。本法による検出限界は 0.2ng/mL であった。一方、BPA の添加回収率 (5 ng/mL 添加) は、平均で

85.2%, 相対標準偏差 RSD は 4.7% (n=5)であった。本法による検出限界は 0.5ng/mLであった。

## 2. 3-PBA, TCP 及び BPA の同時分析法の実試料への応用

本法を用いて山口大学医学部から提供された母体血, 母体尿及び臍帯血 10 組, 合計 30 検体中の 3-PBA, TCP 及び BPA を測定した結果, いずれの試料からも 3-PBA (検出下限 0.2ng/mL), TCP (検出下限 0.2ng/mL) 及び BPA (検出下限 0.5ng/mL) は検出されなかった。

## D 結論

1. ピレスロイド系農薬, 有機リン系農薬クロルピリホス及びビスフェノール A の曝露評価を実施した, ピレスロイド系農薬の曝露評価では, 曝露マーカーとして主代謝物である 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA)を, クロルピリホスの曝露評価には, 主たる代謝物である

3,5,6-Trichloro-2-pyridinol (TCP)を指標成分とした。

2. 母体血, 母体尿, 臍帯血中の 3-PBA, TCP 及び BPA の同時前処理法として,  $\beta$ -グルクロニダーゼによる脱抱合体処理後, Oasis HLB を用いた固相抽出法による分析法を構築した。

3. 本法を用いて山口大学医学部から提供された母体血, 母体尿, 臍帯血 10 組, 計 30 検体を測定した結果, いずれも検出限界以下であった。

## E. 研究業績

該当なし。

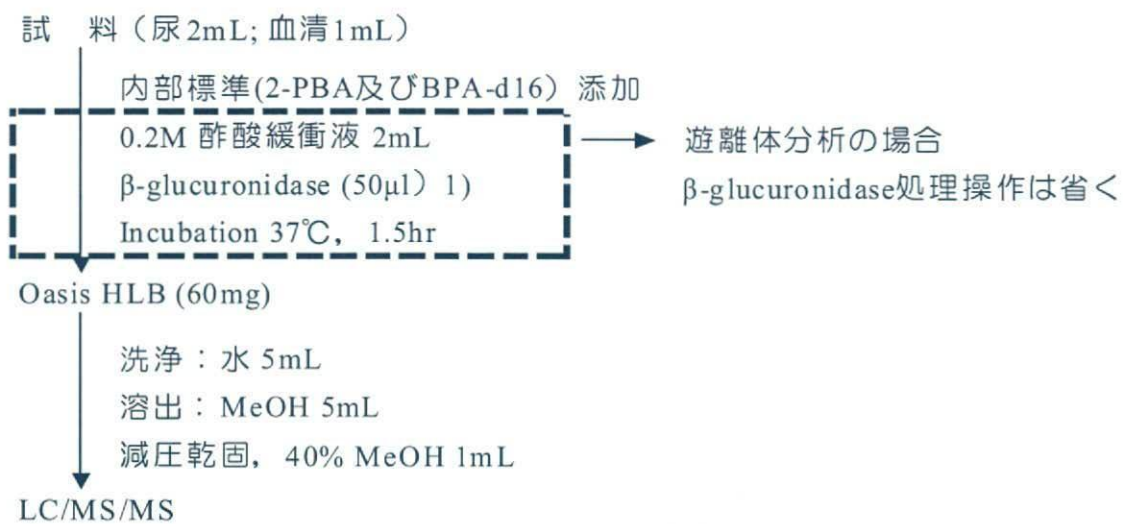
## F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

## G. 健康危険情報

該当なし。

図1 3-PBA, TCP及びBPAの試料調製法



注1) β-glucuronidase は125,000units/mlを0.2M酢酸緩衝液で10倍希釈し, その50μl を使用



表1 LC/MS/MS 測定条件

LC Conditions				
Column	Symmetry C18 (2.1mm x 5cm, 3 $\mu$ m)			
Eluent	0.1% AcOH-MeCN (65:35)			
Flow rate	0.2 mL/min			
MS/MS Conditions				
Ionization	ESI (Nega)		Cone(V)	Coll(eV)
Monitor ion	3-PBA	213>169	30	10
		213>93	30	20
	TCP	196>196	20	10
		198>198	20	10
	2-PBA(IS)	213>169	20	20
		213>93	20	25

表2 LC/MS/MS 測定条件

LC Conditions				
Column	Symmetry C18 (2.1mm x 10cm, 3 $\mu$ m)			
Eluent	0.005% AcOH-MeCN (55:45)			
Flow rate	0.2 mL/min			
MS/MS Conditions				
Ionization	ESI (Nega)		Cone(V)	Coll(eV)
Monitor ion	BPA	227>212	40	20
		227>133	40	20
	BPA-d16	241>223	40	20
		241>142	40	20

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業 分担研究報告書

化学物質の子どもへの健康影響に関するエピジェネティクス評価法の開発  
ヒト生体試料の分析法の開発と分析法の精度管理

平成 20 年度研究課題：「HILIC/MS/MS によるヒト血清中ニコチン代謝物の同時分析法」

研究代表者	牧野 恒久	有隣厚生会	東部病院
研究分担者	中澤 裕之	星薬科大学	薬品分析化学教室
研究協力者	斉藤 貢一	星薬科大学	薬品分析化学教室
	伊藤 里恵	星薬科大学	薬品分析化学教室
	岩崎 雄介	星薬科大学	薬品分析化学教室

研究要旨

妊婦におけるタバコ煙暴露では臍帯の血流量が減少し、胎児に低酸素状態や低栄養状態をもたらすことから、子宮内胎児発育遅延、早産、死産、先天異常や出生体重低下等が高頻度で発生すると報告されており、胎児に与える影響は深刻なものとされている。本研究では、タバコ煙による暴露実態を評価するために、親水性相互作用クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (HILIC/MS/MS) を用いた、生体試料 (母体、臍帯血) 中のニコチン代謝物の同時分析法を構築した。本分析法の検出限界および定量限界はニコチンにおいて、1 および 5 ng/ml であった。また、ヒト血清におけるニコチンの添加回収試験は、 $97.9 \pm 7.1\%$  ( $n = 6$ ) であった。構築した分析法をペア検体である母体、臍帯血に適用したところ、10 検体中 1 検体からニコチンの代謝物質であるコチニン、ヒドロキシコチニンが検出された。

A. 研究目的

環境中には多種多様な化学物質が放出され、ヒトを含む生態系への影響が強く懸念されている。中でも、タバコ煙の構成物質は約 4000 種類とも言われている。わが国においても現在常習的に喫煙をしている者の割合は、年々減少しているにもかかわらず、男性では約 4 割、女性では約 1 割と未だに高く、喫煙による慢性肺疾患や、がん等の生体影響が懸念されている。特に、妊婦におけるタバコ煙暴露では臍帯の血流量が減少し、胎児に低酸素状態や低栄養状態をもたらす

ことから、子宮内胎児発育遅延、早産、死産、先天異常や出生体重低下等が高頻度で発生すると報告されており、胎児に与える影響は深刻なものとされている。現在、タバコ煙による暴露実態を評価するために、血清試料中のニコチンの代謝物がバイオマーカーとして有用とされている。本研究では親水性相互作用クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (HILIC/MS/MS) を用いた、生体試料 (母体、臍帯血) 中のニコチン代謝物の同時分析法を構築した。

B. 研究方法

測定対象物質には主にタバコの煙に含ま

れるニコチンおよびアナバシンと代謝物質である、ノルニコチン、ノルコチニン、コチニン、ニコチン-1-オキシド、コチニン-N-オキシド、ヒドロキシコチニンとした。生体試料の前処理方法には固相抽出法を適用し、Oasis MCX による試料の精製・濃縮を行った。測定には親水性相互作用クロマトグラフ/タンデム質量分析計を使用した。精度の高い分析法を達成するために内標準法を採用した。サロゲート物質としてノルニコチン-d<sub>4</sub>、ニコチン-d<sub>3</sub>、ノルコチニン-d<sub>4</sub>、コチニン-d<sub>3</sub>、ヒドロキシコチニン-d<sub>3</sub>を使用した。

測定機器には Waters 社製 Quattro micro を用いた。イオン化にはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を採用し、ポジティブイオンモードの Multiple Reaction Monitoring (MRM) により分析した。LC の分離条件として、カラムには Waters 社製 Atlantis™ HILIC シリカ (100 mm × 2.1 mm、3 μm) を用いた。移動相はアセトニトリル：水：0.1%ギ酸=60：30：10 となるように設定し、流速 0.2 ml/min で送液した。

(倫理面の配慮)

試料は、山口大学医学部の倫理規定に則って採取された。

## C 研究結果

### C-1. 測定条件の最適化

MS における条件の最適化を計るため、それぞれの標準品を用い、FIA による測定を行った。その結果、ESI のポジティブイオンモードで大きなイオン化が見られた。ニコチン代謝物質 MRM の条件を Table 1 に示す。

ニコチン代謝物は高極性物質であることから、一般的な分析で用いられる ODS カラ

ムでの保持が困難である。そこで、高極性物質の保持が可能な親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を採用した。その結果、Fig. 1 に示すようにそれぞれの化合物の相互分離が達成された。

### C-2. 分析法バリデーション

血清を対象とした分析において、サロゲート物質を用いた内標準法を採用したことで精度の高い分析法の構築ができた。標準品を用いた検出限界 (S/N = 3) および定量限界 (S/N = 10) はニコチンにおいて 1 および 5 ng/ml であった。また、検量線を作成した結果 LOQ ~ 200 ng/ml の濃度範囲において良好な直線性 (相関係数 0.99) が得られた。ヒト血清を用いたニコチンの添加回収試験では、50 ng/ml を添加したところ  $97.9 \pm 7.1\%$  (n = 6) であった (Table 2)。

### C-3. 母体、臍帯血の分析

ヒト暴露評価のために同一のヒト妊婦の母体、臍帯血 (n = 10) を分析した。その結果、10 検体中 1 つのペア検体からニコチンの代謝物質であるコチニン、ヒドロキシコチニンが検出された (Table 3)。これらのことより、胎児がタバコの成分に暴露されている可能性が危惧された。

## D. 結論

本研究において測定対象とした母体、臍帯血試料は、多種多様な夾雑成分を含有している。しかし、構築した分析法は高感度、選択的に分析することができた。本法を母体、臍帯血に適用することでタバコ煙による暴露評価が可能であると考えられる。

E. 研究発表

E-1. 学会発表

なし

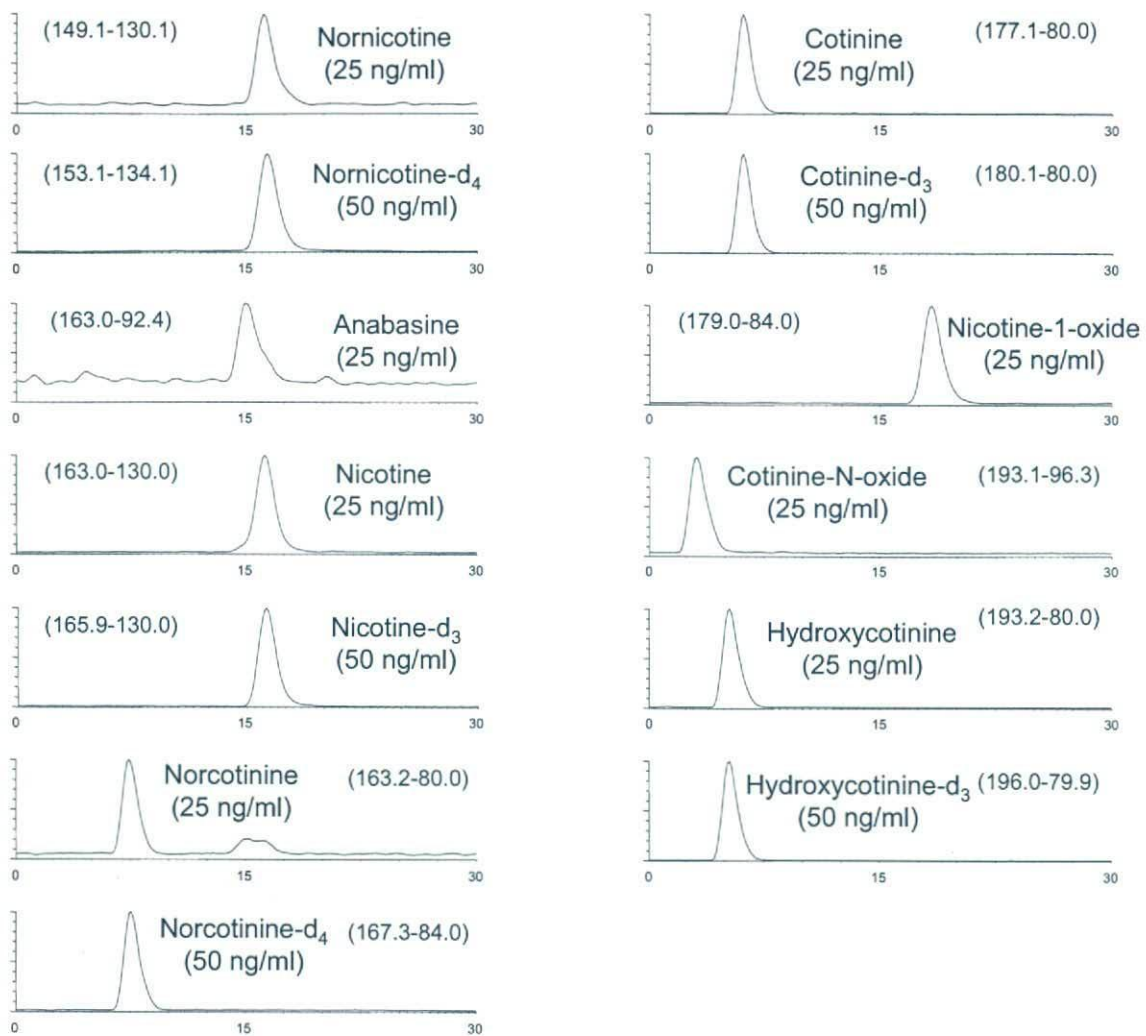


Fig. 1 MRM chromatograms of nicotine metabolic compounds